

0718812-1

На правах рукописи

Гайнуллина Миляуша Якубовна

ЛИГАНДЫ АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ — МОДУЛЯТОРЫ
КЛЕТОЧНОГО МУТАГЕНЕЗА

Специальность: 03.00.04. — биохимия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2000

Работа выполнена на кафедре генетики Казанского государственного университета и на кафедре медицинской биологии и генетики Казанского государственного медицинского университета.

Научные руководители:

доктор биологических наук,
профессор Барабанщиков Б.И.,
доктор медицинских наук,
профессор Семенов В.В.

Официальные оппоненты:

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



846768

доктор медицинских наук,
профессор, Дурнев А.Д.,
кандидат биологических наук
Зобов В.В.

Ведущая организация: — Институт биофизики и биохимии КНЦ РАН

Защита состоится «23» ноября 2000 г. в 14³⁰ час на заседании Диссертационного совета К.053.29.19. при Казанском государственном университете им. В.И. Ульянова-Ленина, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «20» октября 2000 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
доцент

Аскарова А.Н.



Актуальность темы. Лиганд-рецепторные взаимодействия в клетке приводят к развитию специфического ответа и сопровождаются модуляцией целого ряда биохимических процессов, которые в свою очередь изменяют режим работы многих внутриклеточных систем жизнеобеспечения [Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И., 1999]. Учитывая сопряженность мембранной рецепции с регуляторными системами клетки [Ивашкин В.Т., Васильев В.Ю., Северин Е.С., 1987], а также предположение о том, что циклазные системы (в частности цАМФ зависимая система) способны активизировать внутриклеточные системы защиты генома, [Семенов В.В. и др., 1997] логично предположить, что лиганды, взаимодействующие с адренорецепторами, могут влиять на резистентность клеток к мутагенам. Особый интерес вызвал у нас вопрос о способности адреномиметиков и адреноблокаторов проявлять генопротекторные свойства. Ведь это особенно актуально в настоящее время, когда ухудшение экологической ситуации в мире приводит к тревожному возрастанию удельного веса наследственных болезней, врожденных пороков развития, опухолевых заболеваний и других патологий, тесно связанных с повреждением генома человека [Худолей В.В., 1994; Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998; Poot M. et al., 1990; Caggana M. et al., 1991; Mitelman F. et al., 1991; Moustacchi E., 1994; Ashby J. et al., 1996]. Понятно, что в этих условиях поиск антимутагенов, веществ, защищающих генетический аппарат соматических и половых клеток человека от повреждения, является необходимым [Худолей В.В., 1993; Засухина Г.Д., 1994; Тарасов В.А., 1994; Дурнев А.Д., Орещенко А.В., 1996; Дурнев А.Д., Середенин С.Б., 1998].

В настоящее время открыто несколько сотен антимутагенов, однако широкого применения они не нашли до сих пор. Во многом это связано с тем, что механизм генопротекторного действия большинства антимутагенов неизвестен, не оценена степень их безвредности для человека, отсутствуют традиционные фармакотоксикологические исследования антимутагенов на человеке. Понятно, что в этих условиях поиск эффективных супрессоров мутагенеза наиболее рационально проводить среди лекарственных препаратов с изученным механизмом действия и разрешенных Фармакологическим комитетом к применению.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы явилось определение влияния лигандов адренорецепторов на интенсивность процессов индуцированного мутагенеза в клетках бактерий, растений и животных.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить способность стимуляторов и блокаторов α и β адренорецепторов индуцировать мутации у тестерных штаммов *Salmonella typhimurium* TA100 и BA13, в клетках воздушно-сухих семян *Crepis capillaris* и клетках костного мозга мышей.
2. Оценить возможность стимуляторов и блокаторов модифицировать клеточный мутагенез, индуцированный мутагенами – алкиляторами в опытах на:
— штамме *Salmonella typhimurium* BA13
— клетках *Crepis capillaris*
— в клетках костного мозга мышей.
3. Изучить способность блокаторов адренорецепторов модифицировать генетическую активность стимуляторов в опытах на *Crepis capillaris*.

Научная новизна. Впервые установлено, что в сферу действия биологически активных веществ, взаимодействующих с рецепторами, входит не только индукция специфических физиологических функций, но и активация систем, защищающих генетический аппарат от повреждений. Это является основанием для использования методов генетической токсикологии в исследованиях по выяснению механизма функционирования адреномиметиков и адреноблокаторов.

Научно-практическая значимость. В результате проведенной работы впервые выявлены антимутагенные свойства стимуляторов (норадреналина гидротартрата, мезатона, орципреналина сульфата) и блокаторов (пирроксана и обзидана) адренорецепторов в трех тест-системах: тест Эймса, воздушно-сухие семена *Crepis capillaris* и клетки костного мозга мышей (*in vivo*). Это не только расширяет представления о механизме их действия, но и может учитываться при выборе лекарственных препаратов для медицинской практики.

Апробация работы. Результаты работы были доложены на IV научно-практической конференции молодых ученых КГМУ (Казань, 1999), на II съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Санкт-Петербург, 2000), на II съезде медицинских генетиков (Курск,

2000), на ежегодных научных конференциях КГУ (Казань, 1998, 1999, 2000), на научном обществе фармакологов (Казань, 2000).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 10 работ, в том числе 1 статья.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 120 страницах, содержит 46 таблиц. Список используемой литературы включает 203 наименований, из них 94 на русском языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Физиологически активные вещества (ФАВ) используемые в исследованиях

В исследованиях на микроорганизмах, растениях и животных использовали лекарственные препараты, взаимодействующие с адренорецепторами (табл. 1).

Таблица 1

Тест-объекты и исследованные на них препараты

Наименование препарата	Характер действия		Изучены ФАВ			
	Стимулятор	Блокатор	Микроорганизмы		Скерда	Мыши
			Штамм ТА 100	Штамм ВА 13		
АГТ	α и β		+	+	+	+
НГТ			+	+	+	—
МЗТ	α		+	—	+	+
ОСТ	β		+	—	+	+
ПРС		α	+	+	+	+
ОБЗ		β	+	—	+	+

Примечание. Полные названия препаратов см. далее, на стр. 5-6.

“+” препарат изучен, “—” препарат не изучен.

В экспериментах использовали следующие формы препаратов.

Адреналина гидротартрат (АГТ)

Использовали лекарственную форму препарата в ампулах (0,18%) (Харьковское производственное химико-фармацевтическое объединение “Здоровье”).

Норадреналина гидротартрат (НГТ)

Использовали лекарственную форму препарата в ампулах (0,2%) (Харьковская фармацевтическая фирма “Здоровье”).

Мезатон (МЗТ)

Использовали лекарственную форму препарата в ампулах (1%) (Украина, Госкоммедбиопром, Опытный завод ГНЦЛС).

Орипреналина сульфат (ОСТ) (Астмопент (АСМ))

Использовали лекарственную форму препарата в виде дозированного аэрозоля (упаковка содержит взвесь в количестве 400 разовых доз по 0,75 мг) или в ампулах (0,05%) (Познаньский Фармацевтический Завод “ПОЛЬФА” Акционерное Общество).

Пирроксан (ПРС)

Использовали лекарственную форму препарата в таблетках по 0,015 г или в ампулах (1%) (АО “Ай си эн октябрь” Санкт-Петербург).

Обзидан (ОБЗ)

Использовали лекарственную форму препарата в таблетках по 40мг или в ампулах (0,1%) (Произведено в Германии, ISIS PHARMA).

Индукторы мутаций: этилметансульфонат (ЭМС, “Sigma”), циклофосфан (ЦФ, АО “Биохимик” г. Саранск) и нитрозометилмочевина (НММ, “Sigma”)

Методы оценки мутагенной и антимутагенной активности исследуемых соединений

Для исследования генетической активности лигандов использованы тест-объекты, рекомендованные для такого рода исследований.

Следует отметить, что протоколы всех генетических экспериментов учитывали рекомендации, изложенные в материалах ВОЗ [Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ, 1989] и материалах 2-го Международного рабочего совещания в Мельбурне, которые были опубликованы в специальном выпуске журнала “Mutation Research” (vol. 312, № 3) в 1994 г.

Определение генетической активности соединений методом учета генных мутаций в тесте Эймса [Ames B.N. et al., 1975].

В работе использовали два штамма *Salmonella typhimurium* TA100 (hisG46 bio uvrB rfa/pKM101 amp^r (100мкг/мл)) и BA13 (hisG46

araD531 rfa Δgal uvrB/pKM101) (полученный от кафедры генетики Казанского государственного университета).

Исследовалось влияние стимуляторов и блокаторов адренорецепторов на ЭМС- и НММ- индуцированный мутагенез в тесте Эймса. Все исследуемые компоненты вносились вместе с бактериальной суспензией.

Жидкую среду Спицайзен разливали в чашки Петри, распределяя чашки следующим образом в зависимости от вида опыта.

При изучении мутагенной активности ФАВ необходима постановка чистого контроля, то есть в эти чашки (их 4) вносят только растворитель испытуемого вещества (дистиллированную воду) вместе с бактериальной суспензией. Это необходимо для проверки спонтанного уровня мутагенеза у данного штамма бактерий. А в среду для других добавляли исследуемые концентрации стимуляторов и блокаторов адренорецепторов, по 4 чашки на каждую концентрацию.

При изучении антимутагенной активности ФАВ, помимо чистого контроля, необходима постановка и позитивного контроля с индуктором мутаций (4 чашки). В качестве индуктора мутаций у штамма ТА 100 использовали мутаген — нитрозометилмочевину, у штамма ВА 13 супермутаген—этилметансульфонат. В среду для других добавляли мутаген и ФАВ в изучаемых концентрациях (по 4 чашки на каждую концентрацию).

После этого чашки просушивали в термостате при 37°C в течение 2 часов. Биомассу бактерий, предварительно выращенную на полноценной питательной среде в течение 24 часов, ресуспензировали в физиологическом растворе (6 мл) до плотности 10^6 - 10^8 клеток. Затем на поверхность агара наносили суспензию бактерий в объеме 50 мкл на чашку. Нанесенная суспензия растиралась стеклянной палочкой. Чашки ставили в термостат на 1-2 суток при 37°C. По истечении срока колонии подсчитывали и проводили статистическую обработку результатов.

*Анализ генетической активности соединений путем регистрации хромосомных aberrаций оценивали на клетках воздушно-сухих семян *Crepis capillaris* в результате предварительной обработки [Дубинина Л.Г., 1978] в широком диапазоне нетоксических концентраций.*

Семена скерды замачивали 2 часа в дистиллированной воде (контроль). Опытные варианты после замачивания обрабатывали 2 часа стимуляторами или блокаторами адренорецепторов в различных концентрациях. После этого семена промывали 20 минут в проточной воде и обрабатывали 2 часа ЭМС или ЦФ. Вновь промывали 20 минут и помещали в 0,01% раствор колхицина для прорастания (26⁰С). В период 24 - 36 часов роста отбирали проростки с длиной корешков 1,0 - 1,5 мм. Верхушку корешков срезали и фиксировали смесью абсолютный этиловый спирт : ледяная уксусная кислота (3:1). Прокрашивали ацетокармином на водяной бане 10 минут. После 30 минутной экспозиции в насыщенном растворе хлоралгидрата готовили давленные препараты. Регистрировали все типы хромосомных и хроматидных aberrаций.

Изучение генетической активности соединений путем регистрации хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей [Preston R.J. et al., 1987].

Регистрация протекторного действия лекарственного вещества осуществлялась путем учета индуцированных мутагеном хромосомных aberrаций в присутствии и отсутствии ФАВ. Эксперименты выполнены на мышах линии С 57В4/6. На каждый опытный и контрольный вариант брали по 5-6 самцов 1,5-2-х месячного возраста, массой 25-30 гр. Физиологически активные препараты вводили мышам подкожно, однократно. Через 8 часов внутрибрюшинно вводили индуктор мутаций — ЭМС или ЦФ. Мутаген и ФАВ растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед введением животным. Через 24 часа после инъекции мутагена мышей забивали цервикальной дислокацией. За 2,5 часа до окончания опыта мышам внутрибрюшинно вводили колхицин (2,5 мг/кг).

Препараты костного мозга готовили стандартным суховоздушным способом [Ford C.E., Hamerton I.L., 1956]. У каждого животного анализировали по 100 метафаз. Регистрировали клетки с модальным

числом в 40 хромосом с хорошим разбросом без наложений. Подсчитывали фрагменты и обмены хромосом. Гепы не учитывали.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием критерия Стьюдента.

Расчет антимутагенного эффекта производили по формуле [Урбах В.Ю., 1964].

$$АЭ = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \cdot 100$$

где : M_1 — процент метафаз с нарушениями при действии мутагена, M_2 — процент метафаз с нарушениями при действии мутагена и протектора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ генетической активности исследуемых физиологически активных веществ (ФАВ) осуществлялся в несколько этапов. Вначале изучалась мутагенная активность соединений. Это дало возможность отобрать для дальнейших исследований не мутагенные концентрации препаратов.

1. Оценка мутагенного эффекта исследуемых соединений

Большинство взятых для исследования ФАВ в изученных концентрациях в экспериментах на микроорганизмах, *Crepis capillaris* и мышах не обладали мутагенной активностью. Исключение составил адреналина гидротартрат, который в опытах на скерде и мышах, в высокой концентрации, достоверно увеличивал уровень аберраций соответственно в 3,5 и 2,9 раза относительно контроля.

В дальнейших исследованиях адреналина гидротартрат использовали в не мутагенных концентрациях.

2. Оценка антимутагенного эффекта исследуемых соединений

2.1. Оценка антимутагенного эффекта исследуемых соединений в тесте Эймса у штамма BA13 *Salmonella typhimurium*.

Из всех исследованных препаратов только норадреналина гидротартрат и пирроксан снижали уровень индуцированного мутагенеза.

2.2. Определение антимутагенной активности исследуемых соединений на воздушно-сухих семенах *Crepis capillaris*.

Результаты опытов отражены в сводной таблице 2.

Представленные данные показывают, что способностью снижать уровень aberrаций, индуцированных мутагенами, обладают как стимуляторы, так и блокаторы α - и β - адренорецепторов. Однако в большей степени этот эффект выражен у адреноблокаторов.

Таблица 2

Максимальный антимутагенный эффект (МАЭ)
и диапазоны активных концентраций (ДАК)
препаратов в опытах на *Crepis capillaris*

Исследуемые ФАВ (тип рецептора)		Исследуемые параметры и индукторы мутаций			
		МАЭ (в %)		ДАК (в М)	
		ЭМС	ЦФ	ЭМС	ЦФ
Стимуляторы	АГТ (α и β)	64,3	60,8	10^{-10} — 10^{-4}	10^{-10} — 10^{-4}
	НГТ (α)	43,5	47,4	10^{-7}	10^{-8} , 10^{-7}
	МЗТ (α)	не активен	39,0	не активен	10^{-5} , 10^{-4}
	ОСТ (β)	59,3	45,5	10^{-8} — 10^{-3}	10^{-7} , 10^{-4} , 10^{-3}
Блокаторы	ПРС (α)	76,8	47,4	10^{-3} , 10^{-2}	10^{-8} — 10^{-5}
	ОБЗ (β)	77,5	61,5	10^{-7} — 10^{-3}	10^{-8} — 10^{-6} 10^{-4} , 10^{-3}

Необходимо отметить, что ФАВ (и стимуляторы и блокаторы), взаимодействующие с β -адренорецепторами, были эффективнее, чем взаимодействующие с α -адренорецепторами.

Антимутагенный эффект был выявлен у препаратов, как правило, в широком диапазоне концентраций. Особенно это характерно для адреналина гидротартрата, орципреналина сульфата, пирроксана и обзидана (см. табл.2). Практически все исследованные ФАВ обладали способностью редуцировать уровень aberrаций в высоких (не физиологических) концентрациях и в физиологических 10^{-10} — 10^{-7} М.

Из всех исследованных препаратов по диапазону активных концентраций и максимальному антимутагенному эффекту (см. табл. 2) можно выделить как наиболее эффективными — адреналин (адреномиметик) и обзидан (адреноблокатор), а наименее — α -адреномиметик — мезатон. Особо следует отметить разную

способность препаратов снижать уровень аберраций индуцированный ЭМС и ЦФ. Наиболее эффективно препараты подавляли мутагенез индуцированный ЭМС. При этом выявлена следующая характерная особенность: при подавлении ЭМС-индуцированного мутагенеза МАЭ препаратов приходился на высокие не физиологические концентрации. Напротив, при редукции аберраций индуцированных ЦФ МАЭ был ниже, но выявлялся у препаратов в физиологических концентрациях. Исключение составил α -адреномиметик мезатон, который редуцировал мутагенный эффект ЦФ, совершенно не влияя на формирование аберраций, возникших под действием ЭМС.

2.3. Определение антимутагенной активности исследуемых соединений на клетках костного мозга мышей.

Результаты исследований представлены в сводной таблице 3.

Таблица 3

Максимальный антимутагенный эффект и диапазоны активных концентраций изученных ФАВ в опытах на клетках костного мозга мышей

Исследуемые ФАВ (тип рецептора)		Исследуемые параметры и индукторы мутаций			
		МАЭ (в %)		ДАК (в мг/кг)	
		ЭМС	ЦФ	ЭМС	ЦФ
СТ	АГТ (α и β)	65,0	55,2	10^{-3} — 10^{-1}	10^{-3} — 10^{-1}
	МЗТ (α)	34,4	35,3	10^{-3}	10
	ОСТ (β)	35,5	50,0	10^{-1} , 5	10^{-2} , 10^{-1} , 5
БК	ПРС (α)	Не активен			
	ОБЗ (β)	34,3	32,5	1	10^{-2}

Примечание: СТ-стимуляторы, БК-блокаторы.

Анализ результатов показывает, что антимутагенный эффект в опытах *in vivo* на мышах проявился слабее, чем у растений. Наблюдается он как у стимуляторов, так и у блокаторов адренорецепторов. Как и в опытах на растениях, ФАВ, взаимодействующие с α -адренорецепторами, оказались менее эффективными, чем взаимодействующие с β -адренорецепторами. Из всех исследованных препаратов наибольшим антимутагенным эффектом и диапазоном активных концентраций обладали адреналина гидротартрат и орципреналина сульфат. Как и в опытах на растениях, в опытах на мышах ЭМС-индуцированный мутагенез в большей мере поддавался коррекции, чем ЦФ-индуцированный.

3. Модификация протекторного эффекта адреналина гидротартрата α - и β -адреноблокаторами, в условиях предварительной обработки, в опытах на *Crepis capillaris*.

Как известно адреналин относится к стимуляторам α - и β -адренорецепторов. В наших исследованиях он показал себя как эффективный антимутаген. Было интересно определить его протекторный эффект в условиях, когда клетка обработана блокаторами α - и β -адренорецепторов до воздействия адреналина. Сложность постановки такого опыта заключалась в том, что сами блокаторы проявляют антимутагенный эффект. Поэтому необходимо было исключить факт аддитивности эффектов адреналина и блокаторов. С этой целью концентрации блокаторов подбирались таким образом, чтобы они не оказывали по отдельности антимутагенный эффект. Для пирроксана такой концентрацией была $2,68 \cdot 10^{-7}$ М, а для обзидана $3,86 \cdot 10^{-8}$ М, АГТ использовали в концентрации $3,0 \cdot 10^{-9}$ М. В этой концентрации АГТ эффективно снижал уровень аберраций индуцированный ЭМС. Результаты опытов представлены в таблице 4.

Таблица 4

Антимутагенная активность АГТ и ее модификация адреноблокаторами в условиях предварительной обработки на клетках *Crepis capillaris*

Вариант опыта	Общее число метафаз	Общее число аберраций	Частота аберраций (в %)	АЭ	Р
Контроль	888	8	0,90±0,32	—	—
АГТ	1031	19	1,84±0,42	—	>0,05*
ПРС	1081	20	1,85±0,41	—	>0,05*
ОБЗ	574	9	1,57±0,52	—	>0,05*
ПРС+АГТ	938	17	1,81±0,44	—	>0,05*
ОБЗ+АГТ	1073	18	1,68±0,39	—	>0,05*
ЭМС	554	28	5,05±0,93	—	<0,001*
ПРС+ЭМС	866	42	4,85±0,73	4,0	>0,05**
ОБЗ+ЭМС	1207	52	4,31±0,58	14,7	>0,05**
АГТ+ЭМС	1184	22	1,86±0,39	63,2	<0,01**
ПРС+АГТ+ЭМС	1108	34	3,07±0,52	39,2	>0,05**
ОБЗ+АГТ+ЭМС	1180	44	3,73±0,55	26,1	>0,05**

Примечание: * — уровень значимости по сравнению с контролем;

** — уровень значимости по сравнению с ЭМС;

АЭ — антимутагенный эффект; Р — уровень достоверности.

Как видно из таблицы, АГТ достаточно эффективно (на 63,2%) подавлял уровень ЭМС-индуцированных aberrаций. В присутствии блокаторов, независимо от их типа, происходило снижение протекторной активности АГТ.

При этом β -адреноблокатор обзидан в большей степени подавлял АЭ адреналина, чем α -адреноблокатор пирроксан. При блокаде пирроксаном АЭ был равен 39,2%, а при использовании обзидана — 26,1%.

Таким образом, можно заключить, что α и β -блокаторы адренорецепторов активно снижают антимуtagenный эффект адреналина. В большей мере ингибирующий эффект выражен у β -блокатора.

* * *

В своих исследованиях мы определяли способность адренотропных ФАВ индуцировать в клетке два, в сущности противоположных, эффекта — мутагенез и антимуtagenез. Вполне понятно, что добиться этого можно было лишь при изучении генетической активности исследуемых препаратов в широком диапазоне концентраций. В выбранном нами диапазоне находилась область высоких концентраций (10^{-6} — 10^{-2} М) и область физиологических концентраций (10^{-10} — 10^{-7} М), когда биологический эффект препаратов можно было связать с их рецепторным действием [Розен В.Б., 1986; Firn R.D., 1987]. Такой подход позволил выявить небольшой, но достоверный мутагенный эффект высоких концентраций адреналина на *Crepis capillaris* ($5,4 \cdot 10^{-3}$ М) и мышцах (50 мг/кг). В настоящее время мы затрудняемся оценить этот феномен с биологических позиций. Однако известно, что в экстремальных ситуациях у животных и человека их стресс-реализующая система, в том числе и адренергическая, может быть причиной резкого возрастания уровня aberrаций в клетках. Подобный факт неоднократно наблюдали ряд исследователей [Керкис Ю.Я., 1977; Меерсон Ф.З., 1981; Михеев В.С., Анисимова Л.Е., 1988; Середенин С.Б., Дурнев А.Д., 1992; Pasachan S.C., Sabhlok V.P., 1983].

При снижении концентраций адреналина мутагенный эффект (*Crepis capillaris*) сменялся на антимуtagenный. Последний с небольшими колебаниями (во всех случаях различия не достоверны) сохранялся до действующей концентрации адреналина 10^{-10} М в

опытах с семенами и 10^{-3} мг/кг в опытах с мышами независимо от типа алкилятора, индуцировавшего мутагенез. Необходимо отметить, что в опытах на растениях и животных адреналин по сравнению с другими препаратами оказался наиболее эффективным генопротектором: — у него один из наиболее высоких антимутагенных эффектов (табл. 2, 3). Нам представляется, что для выяснения механизма протекторного действия адреналина необходимо в первую очередь исходить из работ [Dehaye J. P. et al., 1980], которые показали, что ввиду быстрого распада адреналина в клетках животных, внутриклеточные взаимодействия этого гормона вряд ли существенны, большее значение имеют его взаимодействия с рецепторами клеточной мембраны. В наших исследованиях были использованы три тест-объекта, имеющие адренорецепторы и не имеющие их. Последнее относится к микроорганизмам, мембранная рецепция которых в значительной степени отличается от животных. Что касается клеток растений, то в монографии [Рощина В.В., 1991] приведены убедительные факты наличия у растений рецепторных структур, подобных адренорецепторам животных.

Рассматривая с этих позиций антимутагенный эффект адреналина на растениях и животных, необходимо отметить, что он был выявлен в широком диапазоне концентраций, в том числе и в низких — 10^{-10} – 10^{-9} М (у растений). При этом антимутагенный эффект адреналина, достигнув определенной величины, имел тенденцию сохраняться с небольшими (как правило не достоверными) колебаниями на протяжении значительного диапазона концентраций. И, наконец, результаты экспериментов, приведенные в разделе 3, свидетельствуют, что блокаторы α - и β -адренорецепторов (пирроксан и обзидан) значительно снижают антимутагенный эффект адреналина. Всё это в совокупности даёт нам основание утверждать, что в реализации антимутагенного потенциала адреналина определенное значение имеют рецепторные образования, активация которых приводит к формированию в клетке резистентности к мутагенам. Понятно, что это не исключает и другие пути формирования клеточного антимутагенеза. Один из таких путей возможно задействован при обработке клеток высокими концентрациями адреналина.

Если антимутагенный эффект адреналина может реализоваться через мембранную рецепцию клетки, то возникает вполне

закономерный вопрос, какие рецепторы принимают в этом участие? Наши исследования не дают возможности однозначно связать супрессорный эффект адреналина с преимущественным действием на какой-либо тип рецептора. Однако, полученные данные позволяют высказать некоторые предположения. Прежде всего это касается исследований по определению антимутагенного эффекта у близкого по химическому строению к адреналину — норадреналина. У последнего отсутствует метильная группа у атома азота и, что особенно существенно для нас, его действие связано с преимущественной стимуляцией α -адренорецепторов в то время как адреналин влияет одновременно на α - и β -адренорецепторы [Машковский М.Д., 1998]. Наши исследования показали, что протекторная активность норадреналина существенно ниже адреналина. Незначительный (менее 50%, *Crepis capillaris*) антимутагенный эффект норадреналина, регистрируемый в узком диапазоне концентраций 10^{-7} М (индуктор ЭМС) и 10^{-8} — 10^{-7} М (индуктор ЦФ), даёт основание считать стимуляцию β -адренорецепторов более значимой для формирования устойчивости клеток к повреждающему действию мутагенов. Это предположение подтверждает анализ антимутагенного эффекта, выявленного у стимуляторов α - и β -адренорецепторов. В опыте на растениях стимулятор α -адренорецепторов (мезатон) или не снижал уровень аберраций индуцированный ЭМС, или проявлял антимутагенный эффект в 1,6 раза слабее, чем адреналин. Существенно то, что этот эффект был присущ мезатону в не физиологических концентрациях (10^{-5} , 10^{-4} М). Стимулятор β -адренорецепторов (орципреналина сульфат) напротив снижал уровень аберраций хромосом, индуцированный ЭМС, соизмеримо с адреналином, а мутации индуцированные ЦФ, соизмеримо с мезатоном. В отличие от мезатона антимутагенный эффект орципреналина сульфата регистрировался в физиологических концентрациях (10^{-8} — 10^{-7} М), что даёт основание предположить о большем участии в формировании антимутагенеза β -адренорецепторов.

Кроме стимуляторов адренорецепторов существенный антимутагенный эффект выявлен у блокаторов α - и β -адренорецепторов. Особого внимания заслуживают два момента: во-первых, для блокаторов характерно наличие высокого

антимутагенного эффекта, превышающего аналогичный эффект стимуляторов и, во-вторых, диапазон их активных концентраций лежит в основном за пределами физиологических концентраций (в основном в пределах 10^{-6} — 10^{-3} М). Это в какой-то мере указывает на неспецифический характер действия блокаторов, но с другой стороны не исключено, что предварительная обработка клеток блокаторами препятствует взаимодействию мутагена с рецептором.

Анализ результатов показал, что ФАВ по-разному действуют на мутагенез, индуцированный различными индукторами мутаций. В одних случаях протекторы эффективнее снижали уровень аберраций индуцированный ЭМС, в других ЦФ. Каких-либо закономерностей при этом обнаружить не удалось. Однако, понятно, что механизм мутагенеза, индуцируемый различными мутагенами (даже находящимися в одной химической группе — алкилирующие вещества), различен и целесообразность применения того или иного протектора должна определяться на основе фармакологической концепции антимутагенеза [Середенин С.Б., Дурнев А.Д., 1992].

И, наконец, антимутагенный эффект ФАВ, полученный на разных моделях, оказался неоднозначным. Это в какой-то мере можно объяснить различным уровнем эволюционного развития рецепторных систем у микроорганизмов, растений и животных.

И в заключении необходимо отметить, что наши исследования ставят вопрос о наличии на уровне организма антимутагенной системы, существенным компонентом которой является мембранная рецепция клеток. По механизму своего действия эта система полирецепторна (в ней принимают участие представители различных типов рецепторов) и поливалентна (и стимуляторы и блокаторы рецепторов участвуют в формировании клеточного антимутагенеза).

ВЫВОДЫ

1. Стимуляторы и блокаторы α - и β - адренорецепторов не обладают мутагенной активностью в тесте Эймса. Норадреналина гидротартрат (100 мкг/мл) и пирроксан (100 мкг/мл, 200 мкг/мл) снижают уровень этилметансульфонат-индуцированного мутагенеза у штамма *Salmonella typhimurium* BA13.
2. Стимуляторы и блокаторы α - и β - адренорецепторов, за исключением адреналина гидротартрата, не обладают мутагенной активностью в клетках *Crepis capillaris* и клетках костного мозга мышей. Адреналина гидротартрат в высокой концентрации ($5,4 \cdot 10^{-3}$ М и 50 мг/кг) достоверно повышает уровень aberrаций в клетках *Crepis capillaris* и клетках костного мозга мышей.
3. Стимуляторы α - и β - адренорецепторов в большей степени проявляют протекторный эффект у животных клеток, а блокаторы адренорецепторов — растительных.
4. Блокаторы и стимуляторы β -адренорецепторов более эффективно снижают уровень хромосомных aberrаций в клетках растений и животных, чем лиганды α -адренорецепторов.
5. Генопротекторный эффект стимуляторов α - и β - адренорецепторов предупреждается соответствующими блокаторами при условии предварительной обработки ими клеток *Crepis capillaris*.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Семенов В.В., Ибрагимова М.Я., Барабанщиков Б.И. Модификация адреналином мутагенного действия этилметансульфоната // Бюл. exper. биол. — 1998. — Т. 126, № 10. — С. 427-429.
2. Ибрагимова М.Я. Влияние адреналина и агонистов α -адренорецепторов на этилметансульфонат индуцированный мутагенез // Материалы научной конференции, посвященной 60-летию Заслуженного деятеля науки РТ, доктора биологических наук, профессора Ф.Г. Ситдикова. Проблемы адаптации растущего организма к физической и умственной нагрузке. — Казань, 1998. — С. 77-78.
3. Ибрагимова М.Я. Биологическая активность адреналина // IV научно-практическая конференция молодых ученых. Тезисы (19 июня 1999 года) / Казань: КГМУ, 1999. — С. 35-36.
4. Ибрагимова М.Я., Бабынин Э.В. Генетическая активность физиологически активных веществ в тесте Эймса // IV научно-практическая конференция молодых ученых. Тезисы (19 июня 1999 года) / Казань: КГМУ, 1999. — С. 36-37.
5. Семенов В.В., Ибрагимова М.Я., Барабанщиков Б.И., Ибрагимова А.М. Сравнительное исследование влияния α -адреномиметиков и α -адреноблокаторов на цитогенетические эффекты этилметансульфоната у *Crepis capillaris* / Новое в медицине: Сборник научных трудов Казанского государственного медицинского университета — Казань: Буквица, 1999. — Вып. 1. — С. 48-49.
6. Семенов В.В., Ибрагимова М.Я., Барабанщиков Б.И., Ибрагимова А.М. Изучение генетической активности мезатона и орципреналина сульфата при циклофосфан и этилметансульфонат индуцированном мутагенезе у мышей / Новое в медицине: Сборник научных трудов Казанского государственного медицинского университета — Казань: Буквица, 1999. — Вып. 1. — С. 49-50.
7. Семенов В.В., Ибрагимова М.Я., Барабанщиков Б.И., Ибрагимова А.М. Изучение антимутагенной активности α -адреноблокатора пирроксана и β -адреноблокатора обзидана на клетках костного

- мозга мышей / Новое в медицине: Сборник научных трудов Казанского государственного медицинского университета — Казань: Буквица, 1999. — Вып. 1. — С. 50.
8. Ибрагимова М.Я. Модификация орципреналина сульфатом мутагенного эффекта этилметансульфоната и циклофосфана // II съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров. Тезисы (1-5 февраля 2000 года) / Санкт-Петербург: НИИ химии СПбГУ, 2000. — Т. 2. — С. 157.
 9. Ибрагимова М.Я. Модификация протекторного эффекта адреналина гидротартрата α - и β - адреноблокаторами в условиях предварительной и последующей обработки, в опытах на *Crepis capillaris* // II Российский съезд медицинских генетиков. Тезисы (17-19 мая 2000 года) / Курск, 2000. — Ч. 1.— С. 306-308.
 10. Семенов В.В., Барабанщиков Б.И., Ибрагимова М.Я., Харитонов В.С. Кластогенный и антикластогенный эффект лигандов адреналиновых и пуриновых рецепторов // II Российский съезд медицинских генетиков. Тезисы (17-19 мая 2000 года) / Курск, 2000. — Ч. 2.— С. 240-241.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'I. Ibrahimo' or similar, with a stylized flourish at the end.

д-во

Подписано в печать 20.10.2000. Формат 60х84/16
Усл. печ. л. 1,25. Дог. № 26. Тираж 100
Лаборатория оперативной печати ТГТИ
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373